

# Structure of the human angiotensinogen gene and its regulation in cultured cells and transgenic mice

著者	Takahashi Shigeru
内容記述	Thesis (Ph.D.)--University of Tsukuba, (A), no. 1041, 1992.3.25
発行年	1992
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/6166">http://hdl.handle.net/2241/6166</a>

氏 名(本 籍)	たか はし しげる 高 橋 滋 (北 海 道)
学 位 の 種 類	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1041 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学位論文題目	Structure of the Human Angiotensinogen Gene and Its Regulation in Cultured Cells and Transgenic Mice (ヒト・アンジオテンシノーゲン遺伝子の構造と培養細胞及び遺伝子導入マウスにおける同遺伝子発現の解析)
主 査	筑波大学教授 農学博士 村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授 理学博士 山 根 國 男
副 査	筑波大学教授 Ph. D. 柳 澤 嘉 一 郎
副 査	筑波大学助教授 農学博士 星 野 貴 行

## 論 文 の 要 旨

アンジオテンシノーゲン (AG) は、血圧調節などの生理活性を有するペプチドホルモン、アンジオテンシン II (AII) の前駆体である。AGは主に肝臓で合成された後、アスパルチルプロテアーゼであるレニンにより切断を受けてアンジオテンシン I (AI) に変換される。さらにこのAIは、変換酵素により切断を受けてAIIに変換される。このAIIは、血管の収縮及び副腎でのアルドステロンの放出を通して血圧調節に関与する。またAIIは、血管収縮作用だけでなく血管新生に関与する因子として、そして神経伝達因子として作用することも示唆されている。

最近ラットAG遺伝子の構造が報告された。そしてその構造がセリンプロテアーゼスーパーファミリーの一員であるヒト・ $\alpha_1$ -アンチトリプシン、 $\alpha_1$ -アンチキモトリプシン遺伝子の構造と酷似しており、これらは共通の祖先遺伝子から進化したと考えられている。事実、ヒトにおいて急性炎症時に血清のAGレベルが上昇すること、*E. coli*のLPS (Lipopoly Saccharide) を投与したラットにおいて肝臓のAGレベルが5～10倍に上昇することが報告されている。セリンプロテアーゼインヒビターのファミリーは急性期反応に関与するタンパク質であり、AGも急性期タンパクである可能性が示唆された。また、AGはステロイドホルモンによりその血中濃度が上昇することが知られており、遺伝子の転写がステロイドホルモンによって行われている可能性が示唆されている。このように幾つかの機能を有するペプチドホルモンであるAIIの生理作用、またその前駆体であるAGの遺伝子構造とその発現調節を解析するためにラット・AGcDNA、ラットAG遺伝子、ヒト・AG(hAG)

cDNAの単離, 構造解析が行われてきた。しかし遺伝子の発現調節に関与する制御配列についてはまだ同定が行われていない。そこで本研究ではhAGcDNAをプローブとしてヒト胎盤DNAライブラリーよりAG遺伝子を単離し構造決定を行った。そして更に発現調節についての基礎的な検討を行った。

近年, 発生工学的技術が著しく発展し, 遺伝子導入トランスジェニック動物が数多く作製されるようになってきている。トランスジェニック動物創作の利点の一つは, 機能が不明な遺伝子の解析や, 個体発生に伴う遺伝子の発現調節機構の解析に適していることである。特に, ヒト疾患モデル動物の作出はこの分野の最大の目標である。hAG遺伝子の細胞レベルでの発現調節のメカニズムの解析に加えて, 個体レベルでの発現制御を研究するため, また, ヒト高血圧モデル動物を作製するための第一歩としてhAG遺伝子導入マウスを作製した。そして導入した14kbのhAG遺伝子がどのような組織特異的な発現をしているかを調べた。また, 14kbフラグメントの培養細胞における転写活性をも合わせて検討した。

〔1〕ヒト・アンジオテンシノーゲン遺伝子の単離及び構造決定とプロモーター解析hAGcDNAをプローブとして, ヒト胎盤DNAライブラリーよりAG遺伝子をスクリーニングした。その結果,  $6.0 \times 10^5$ 個のプラークから1個のポジティブなクローンを得た。このクローンについて制限酵素地図を作製し, pUC19ベクターへサブクローニングした後, サンガー法によりエクソンとエクソン・イントロ結合部及び5'上流1.3kb領域の塩基配列を決定した。hAG遺伝子は全長12kbで5つのエクソンと4つのイントロンから構成されていた。また, hAG遺伝子のエクソン・イントロンの位置関係は, 既に報告されているラット・AG遺伝子と同様にセリンプロテアーゼインヒビタースーパーファミリーの一員であるヒト・ $\alpha_1$ -アンチトリプシン遺伝子のものと非常に類似しており, イントロがアミノ酸のコドンで分断する様式も二つの遺伝子の対応するイントロンで同一であった。

一般に遺伝子の転写は上流領域の配列により調節されている事が知られている。そこで転写開始点より5'上流の配列を調べてみるとTATA boxが上流31bpの位置に存在していた。さらにその上流にはグルコルチコイドやエストロゲン応答因子, acute phase responsive elementおよびheat shock elementなどが存在した。AGはグルコルチコイド, エストロゲンにより, また, 急性炎症疾患時にその血中濃度が上昇することが知られておりhAG遺伝子の転写がステロイドホルモンや急性炎症によって行われている可能性が示唆された。このように5'上流領域はhAG遺伝子の発現調節に重要な働きをしていると思われる。

ところで, hAG遺伝子は肝臓や肝癌由来の細胞株, HepG2で大量に発現しているが, これ以外の組織または細胞株での発現をノーザン法を用いて検討した。その結果, ヒト・腎臓やヒト・グリア細胞種由来のA172細胞で低いながらその発現が認められた。しかし, HeLa, Chang liver, HT1080及びT98Gではその発現は認められなかった。

次に, hAG遺伝子の細胞特異的な発現調節を理解する最初の試みとして, CATアッセイの系を用いて遺伝子5'上流のプロモーター活性を調べた。エクソン1を含む上流1.3kbのフラグメントをレポーター遺伝子である大腸菌由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺

伝子につなぎキメラ遺伝子を作製した。さらに、この1.3kbのフラグメントを欠失させて種々の変異体を作製した。これらのキメラ遺伝子をヒト・肝臓由来のHepG2（AG産生細胞）とヒト・脳由来のT98G細胞（非産生細胞）にリン酸カルシウム法で一過性に導入した。その1.3kbのフラグメントは、HepG2においてCAT遺伝子の転写を活性化したが、逆向きでは不活性であった。また、T98Gではこのフラグメントは不活性であった。このことはhAG遺伝子の上流1.3kbの中に細胞特異的な発現を制御する領域があることを示唆している。この発現調節に重要な領域を限定するために欠失変異体の転写活性を調べてみると、T98Gでは全てのキメラ遺伝子は不活性であった。ところが驚いたことに、HepG2においてはエクソン1とTATA boxを含む上流-32bpまでの全長72bpの領域まで高いCAT活性を示した。そしてエクソン1は含まないがTATA boxと上流1.2kbを含むフラグメントでは、その活性は激減した。このことはエクソン1を含む短い72bpの領域がhAG遺伝子発現に重要であることを示唆するものである。

## 〔II〕ヒト・アンジオテンシノーゲン遺伝子導入マウスの作製

hAG遺伝子の固体レベルにおける発現制御を理解するために、また、ヒト・高血圧症のモデル動物作製の第一歩として、hAG遺伝子導入マウスの作製を試みた。C57BL/6マウス受精卵の前核に5'上流13kb及び3'下流領域を含む全長14kbのhAG遺伝子を注入し、レシピエントマウスの子宮へ移植した。生まれてきマウスの尾よりDNAを抽出したサザン法を行ったところ、29匹の子供の内2匹にhAG遺伝子が導入されており、それぞれhAG 2-5、hAG 3-2と命名した。これら二匹をもとに二系統のhAG遺伝子導入マウスを確立した。サザン法による解析の結果、両系統ともに数百コピーのhAG遺伝子が際立った再構成なしに導入されていた。次に、マウスの様々な組織からRNAを抽出し、ノーザン法によってhAG遺伝子の組織特異的な発現を調べた。その結果AGの主な産生部位である肝臓において多量の発現が見られた。しかも、そのRNAの分子量はコントロールのHepG2由来のhAGmRNAと同じ約2 kbであった。また、プライマー伸長法の結果からhAGの転写は正確な転写開始点から行われている事が分かった。以上のことからhAG遺伝子はマウスにおいて、転写開始、スプライシングそしてポリA付加が正しく行われていることが示唆された。次に他の臓器での発現を調べてみると、驚くべきことに、本来発現量が非常に低い腎臓において肝臓と同程度の発現が見られた。これらの結果から肝臓においては導入遺伝子の発現は組織特異的に制御されているが、腎臓では抑制を受けていないことが示唆された。そこでhAG遺伝子の発現調節のメカニズムを調べるためにhAG14kbの部分をいくつかの断片に分け、hAG上流1.3kbをプロモーターとするCAT遺伝子の下流に組み込んだキメラ遺伝子を作製し、HepG2、ヒト・腎臓由来の293（AG非産生細胞）、T98G細胞へ導入した。その結果HepG2、293細胞では全てのキメラ遺伝子の発現が誘導された。それに対してT98G細胞ではその発現は非常に低かった。これらの結果から、上流1.3kb領域はhAGの肝臓のみならず腎臓での発現誘導にも必須であること、さらにマウスへの遺伝子導入に用いた14kbには腎臓での発現を抑制する領域が欠けていることが示唆された。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、血圧調節などの生理作用に重要な働きをしているヒト・アンジオテンシノーゲン遺伝子の一次構造を明らかにし、そして培養細胞を用いてその基礎的な発現に必要な領域を同定した。さらに、ヒト・アンジオテンシノーゲン遺伝子導入マウスを作製し、個体レベルでの発現調節の解析を行っている。

このようにヒト・アンジオテンシノーゲン遺伝子の単離、一次構造の決定、培養細胞での発現、そして個体での発現を解析することにより得られた多くの新しい知見は、真核生物遺伝子の発現調節及びヒト高血圧症の研究の発展に意味あることであり、特にヒト・アンジオテンシノーゲン遺伝子導入マウスの作製はヒト高血圧症のモデル動物作製の第一歩として特筆に値する成果であると思われる。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。